# WELTORGANISATION FOR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: C07D 277/04, A61K 31/425, C07D 295/18, 417/12

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

**WO 99/61431** 

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

2. Dezember 1999 (02.12.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/03712

(22) Internationales Anmeldedatum:

28. Mai 1999 (28.05.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 23 831.2

28. Mai 1998 (28.05.98)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PRO-BIODRUG GESELLSCHAFT FÜR ARZNEIMIT-TELFORSCHUNG MBH [DE/DE]; Weinbergweg 22, D-06120 Halle (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Hegelstrasse 14, D-06114 Halle (DE). GLUND, Konrad [DE/DE]; Aralienstrasse 10, D-06122 Halle (DE). SCHLENZIG, Dagmar [DE/DE]; Hegelstrasse 12, D-06114 Halle (DE). KRUBER, Susanne [DE/DE]; Reilstrasse 9, D-06114 Halle (DE).
- (74) Anwälte: FORSTMEYER, Dietmar, G. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, IP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: NEW DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV EFFECTORS

(54) Bezeichnung: NEUE EFFEKTOREN VON DIPEPTIDYLPEPTIDASE IV

#### (57) Abstract

The invention relates to dipeptide compounds or compounds analogous to dipeptide compounds, which are made of an amino acid and a thiazolidine or pyrrolidine group, and to their salts. The invention further relates to the use of these compounds in the treatment of impaired glucose tolerance, glucosuria, hyperlipidemia, metabolic acidoses, diabetes mellitus, diabetic neuropathy and nephropathy as well as secondary diseases of diabetes mellitus in mammals.

#### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Dipeptidverbindungen bzw. zu Dipeptidverbindungen analoge Verbindungen, die aus einer Aminosaure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze, und die Verwendung der Verbindungen zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finaland	LT	Litanen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑÜ	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tachad .
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldan	TG	Togo
BB	Barbados	· GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadachikistan
BR	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungara	ML	Mali	TT	
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Trinidad und Tobago Ukraine
BR	Brasilien	IL.	Israel	MR	Mauretanien	UG	
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Uganda
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE			Amerika
CG	Kongo	KR	Kenia	NL NL	Niger	UZ	Usbekistan
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO .	Niederlande	VN	Vietnam
CI	Côte d'Ivoire	KP			Norwegen	YU	Jugoslawien
CM	Kamerun	IV.	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	ZW	Zimbabwe
CN	China	***	Korea	PL	Polen		
CU	Kuba	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CZ		KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
	Tschechische Republik	rc	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark Betlend	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		

#### NEUE EFFEKTOREN VON DIPEPTIDYLPEPTIDASE IV

Die vorliegende Erfindung betrifft Dipeptidverbindungen bzw. zu Dipeptidverbindungen analoge Verbindungen, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze, im weiteren Dipeptidverbindungen genannt, und die Verwendung der Verbindungen zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

Die Erfindung betrifft also auch ein einfaches Verfahren zur Senkung der Blutzuckerkonzentration von Säugern mit Hilfe von Dipeptidverbindungen als aktivitätsmindernde Effektoren (Substraten, Pseudosubstraten, Inhibitoren, Bindungsproteinen, Antikörpern u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen.

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-2 (GIP, ) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1, ), also Hormone, die die Glukose-induzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch Incretine genannt), sind Substrate der DP IV, da diese von den

N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin in vitro und in vivo abspalten kann.

Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher Substrate in vivo kann dazu dienen,
unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen wie auch
bei pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu
unterdrücken. Z.B. basiert Diabetes mellitus Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion bzw.
Störungen in der Rezeptorfunktion, die u.a. in proteolytisch
bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet
sind.

Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch Diabetes mellitus) werden nach gegenwärtigem
Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z.B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, wie auch modernere Verfahren, zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch entscheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche i.v. Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen.

Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injektionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhansscher Zellen in die funktionsgestörte Pan-

kreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung des Immunsystems.

Die Verwendung von Alanyl-Pyrrolidid und Isoleucyl-Thiazolidid als Inhibitoren von DP IV bzw. von zu DP IV analoger Enzymaktivität ist bereits aus der PCT/DE 97/00820 und die Verwendung von Isoleucyl-Pyrrolidid und Isoleucyl-Thiazolidid-Hydrochlorid bereits aus der DD 296 075 bekannt. Bei dem in diesem Stand der Technik eingesetzten Isoleucyl-Thiazolidid handelt es sich um natürliches, also L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid: Zum Prioritätsdatum und noch am Anmeldetag der beiden Druckschriften stand nur diese, die natürliche Form von Isoleucyl-Thiazolidid zur Verfügung.

Es ist festgestellt worden, daß diese Verbindungen, insbesondere L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid, gute Effektoren für DP IV und DP IV analoge Enzymaktivitäten sind. Bei der Verwendung dieser Verbindung können bei einigen Patienten bzw. Krankheitsformen jedoch gewisse Probleme auftreten:

Je nach Symptomen und Schwere z.B. von Diabetes mellitus, wäre es z.B. wünschenswert, Effektoren zur Verfügung zu haben, die eine andere Wirkung als die bekannten Verbindungen aufweisen: So ist bekannt, daß Diabetes-mellitus-Patienten individuell "eingestellt" werden müssen, um eine optimale Behandlung ihrer Krankheit zu ermöglichen. So sollte bei einigen Fällen z.B. eine verringerte Aktivität von DP IV Effektoren ausreichen. Auch könnte eine zu hohe Inhibitor Aktivität und die permanen-

te Verabreichung desselben Medikaments insbesondere wegen der lebenslangen Dauer der Behandlung unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge haben. Weiter könnte es auch wünschenwert sein, gewisse Transporteigenschaften zur Erhöhung der Resorptionsgeschwindigkeit der Effektoren in vivo zu verbessern.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, neue (insbesondere aktivitätsmindernde) Effektoren zur Behandlung von z.B. beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern und ein einfaches Verfahren zur Behandlung dieser Krankheiten bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Dipeptidverbindungen bzw. Analoga von Dipeptiden, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze gelöst.

Bei der - vorzugsweise oralen - Verabreichung dieser Effektoren an einen Säugerorganismus werden die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide GIP<sub>1-42</sub> und GLP-1<sub>7-36</sub> (o.a. GLP-1<sub>7-37</sub>, oder deren Analoga) durch DP IV-oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert. Der Erfindung liegt also der Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukosestimulierten, oder extern zugeführten Incretine (oder deren Analoga) führt, d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-anloger Proteine der Incretin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann;

- 2. die erhöhte biologische Abbaustabilität der Incretine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat;
- 3. die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-analogen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Incretine in einer nachfolgenden Veränderung der Glukose-induzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulierung des Blut-Glukosespiegels führt.

Insbesondere sind dazu erfindungsgemäß Dipeptidverbindungen geeignet, bei denen die Aminosäure aus einer natürlichen Aminosäure, wie z.B. Leucin, Valin, Glutamin, Prolin, Isoleucin, Asparagin oder Asparaginsäure, ausgewählt wird.

Die möglichst orale Applikation der erfindungsgemäßen hochaffinen, niedermolekularen Enzyminhibitoren ist eine kostengünstigere Alternative z.B. zu invasiven chirurgischen Techniken
bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und ClearanceEigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden.

Wie vorstehend erwähnt, kann es z.B. bei der Dauerbehandlung von Diabetes mellitus erforderlich sein, Effektoren mit einer definierten Aktivität zur Verfügung zu stellen, mit denen individuelle Bedürfnisse von Patienten erfüllt bzw. Symptome behandelt werden können. Die erfindungsgemäßen Dipeptidverbindungen weisen daher bei einer Konzentration (der Dipeptidverbindungen) von 10 µM, insbesondere bei den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen, eine Aktivitätsminderung von Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten von mindestens 10, bevorzugt von mindestens 40 % auf. Häufig ist auch eine Aktivitätsminderung von mindestens 60 % bzw. mindestens 70 % erforderlich. Bevorzugte Effektoren können auch eine Aktivitätsminderung von maximal 20 % bzw. 30 % aufweisen. Weiterhin sind die Transporteigenschaften der vorliegenden Verbindungen, insbesondere durch den Peptidtransporter Pep T1 deutlich verbessert.

Besonders bevorzugte Dipeptidverbindungen sind L-alloIsoleucyl-Thiazolidid und seine Salze. Diese Verbindungen weisen im Verhältnis zu L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid bei in etwa gleichgroßer Wirkung bezüglich der Glukosemodulation überraschenderweise einen ca. fünffach besseren Transport durch den Peptidtransporter Pep T1 auf.

Weitere bevorzugte Verbindungen werden in Tabelle 1 angegeben.

Die Salze der erfindungsgemäßen Dipeptidverbindungen können z.B. organische Salze wie Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate sein. Besonders bevorzugt werden die Fumarate, die eine hervorragende Wirkung bei einer überraschend hohen Stabilität gegenüber Hydrolyse aufweisen und wesentlich weniger löslich sind als die Hydrochloride. Diese Eigenschaften sind auch bei der Galenik von Vorteil.

Ferner werden L-threo Isoleucyl Pyrrolidid und seine Salze, insbesondere die Fumarsalze, und L-allo Isoleucyl Pyrrolidid und seine Salze, insbesondere die Fumarsalze, bevorzugt.

Die Salze der Dipeptidverbindungen können in einem molaren Verhältnis von Dipeptid(analogon)komponente zu Salzkomponente von 1 : 1 oder 2 : 1 vorliegen. Ein derartiges Salz ist z.B. (Ile-Thia), Fumarsäure.

Besonders bevorzugte Salze sind die Fumarsalze von L-threo-Isoleucyl Thiazolidid und L-allo-Isoleucyl Thiazolidid.

Die Erfindung betrifft somit Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität und deren Verwendung zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Effektoren der DP IVbzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität zur Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen wie z.B. beeinträchtigte Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einem Säuger-Organismus eine therapeutisch wirksame Menge mindestens eines erfindungsgemäßen Effektors der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität verabreicht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, also Medikamente, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung oder deren Salze gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthalten.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können z.B. als parenterale oder enterale Formulierungen vorliegen und entsprechende Träger enthalten bzw. sie können als orale Formulierungen vorliegen, die entsprechende zur oralen Verabreichung geeignete Träger enthalten können. Vorzugsweise liegen sie als orale Formulierungen vor.

Zusätzlich können die pharmazeutischen Zusammensetzungen einen oder mehrere hypoglykämisch wirkende Wirkstoffe enthalten, die an sich bekannte Wirkstoffe sein können.

Die erfindungsgemäßen Effektoren der DP IV bzw. der DP IVanalogen Enzymaktivität können zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus bzw. zur Herstellung eines entsprechenden Medikaments verwendet werden.

Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungen oder Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV-bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäße Effektoren

sind z.B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptidderivate bzw. Dipeptidmimetika L-allo-Isoleucyl-Thiazolidid und die in Tabelle 1 angegebenen Effektoren und deren Fumarsalze. Die erfindungsgemäßen Effektoren ermöglichen eine individuell einstellbare Behandlung von Patienten bzw. Krankheiten, wobei insbesondere individuell auftretende Unverträglichkeiten, Allergien und Nebenwirkungen vermieden werden können.

Auch weisen die Verbindungen unterschiedliche zeitliche Verläufe der Wirksamkeit auf. Dadurch wird dem behandelnden Arzt die Möglichkeit in die Hand gegeben, differenziert auf die individuelle Situation eines Patienten zu reagieren: Einerseits kann er die Geschwindigkeit des Eintritts der Wirkung und andererseits die Dauer der Wirkung und insbesondere die Stärke der Wirkung genau einstellen.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und
zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen,
die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, bei
Säugern und insbesondere in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren werden z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten verabreicht, die den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien enthalten. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. i.v., in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen pro Tag einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z.B. kann ein solcher Dosisbereich beim Menschen im Bereich von 0.01 mg bis 30.0 mg pro Tag, vorzugsweise im Bereich von 0.01 bis 10 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm Körpergewicht liegen.

Es wurde gefunden, daß durch Verabreichung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten im Blut eines Säugers, durch deren damit verbundene, temporäre Aktivitätsreduktion, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP<sub>1-42</sub>) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP- $1_{7-36}$ ) (o.a. GLP- $1_{7-37}$  oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert werden. Die durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielte, erhöhte Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert u.a. die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht.

Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des
behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie
beeinträchtigte Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie
sowie mögliche schwere metabolische Azidosen und Diabetes mellitus, Krankheitsbilder die Folge einer über einen längeren

Zeitraum erhöhten Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden.

In der Reihe der aus dem Stand der Technik bekannten, oral wirksamen Antidiabetika ist bisher eine derartig wirksame, niedermolekulare Substanzklasse (mit Ausnahme des Biguanides Metformin: Molekulargewicht 130) nicht bekannt. Die Molekulargewichte der Aminoacyl Thiazolidide bewegen sich zwischen 146 (Glycyl Thiazolidid), 203 (Isoleucyl Thiazolidid) und 275 (Tryptophanoyl Thiazolidid). Im Vergleich bewegen sich die Molekulargewichte der Sulphonylharnstoffe (Glibenclamid: 494), der Saccharide (Acarbose: 630) sowie der Thiazolidindione (Pioglitazon: 586) im Bereich um 500 bis 700 Da. Physiologisch werden Aminoacyl Thiazolidide durch Aminopeptidasen sowie durch saure Hydrolyse in körpereigene Substanzen, wie Aminosäuren und Cysteamin, hydrolysiert, so daß die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen als oral verfügbare Antidiabetika eine Bereicherung der Pharmazie darstellt.

Bei Ratten und Mäusen ist experimentell induzierte Hyperglykämie durch orale Verabreichung mit den erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen überdurchschnittlich gut behandelbar (Tabellen 2 und 3). Die Verabreichung des 500- bis 1000-fachen der wirksamen Dosis führte zu keiner nachweisbaren pathologischen Veränderung während drei-wöchiger toxikologischer Experimente an Ratten und Mäusen.

Die vorteilhafte Wirkung von erfindungsgemäßen Verbindungen auf DP IV ist in Tabelle 1 beispielhaft belegt:

Tabelle 1: Wirkung verschiedener Effektoren auf die durch Dipeptidyl Peptidase IV katalysierte Hydrolyse von
0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH
7,6 und einer Ionenstärke von 0,125.

Effektor	Effektoraffinität zu	% Restaktivität der DP IV in		
·	DP IV: Ki [nM]	Gegenwart von 10 μM Effektor		
Metformin	» 1.000.000	100		
Glibenclamid	» 1.000.000	100		
Acarbose	» 1.000.000	100		
H-Asn-Pyrrolidid	12.000	83,1		
H-Asn-Thiazolidid	3.500	47,2		
H-Asp-Pyrrolidid	14.000	81,6		
H-Asp-Thiazolidid	2.900	45,6		
H-Asp(NHOH)-Pyrrolidid	13.000	88,2		
H-Asp(NHOH)-Thiazolidid	8.800	54,5		
H-Glu-Pyrrolidid	2.200	38,5		
H-Glu-Thiazolidid	610	25,0		
H-Glu(NHOH)-Pyrrolidid	2.800	44,9		
H-Glu(NHOH)-Thiazolidid	1.700	36,5		
H-His-Pyrrolidid	3.500	49,7		
H-His-Thiazolidid	1.800	35,2		
H-Pro-Pvrrolidid	4.100	50,2		
H-Pro-Thiazolidid	1.200	27,2		
H-Ile-Azididid	3.100	43,8		
H-Ile-Pyrrolidid	210	12,3		
H-L-allo-lie-Thiazolidid	190	10,0		
H-Val-Pyrrolidid	480	23,3		
H-Val-Thiazolidid	270	13,6		

Es ist bekannt, daß Aminoacyl Pyrrolidide und Aminoacyl Thiazolidide durch die in den Mucosazellen des Dünndarms, im Serum und in Leberzellen vorhandenen Enzyme Prolin Aminopeptidase und Prolidase abgebaut werden können und der Thiazolidinring zur Öffnung in Gegenwart von Säuren (beispielsweise im Magen) unter Bildung des adäquaten Cysteamin-Derivates neigt [vgl. US 458407]. Es war daher überraschend, eine dosisabhängige Wirksamkeit der Wirkstoffe nach per oraler Verabreichung zu finden. Die Dosisabhängigkeit der Wirkung von L-allo-Ile-Thiazolidid auf die Serum-DP IV Aktivität nach oraler Applikation von L-allo-Isoleucyl Thiazolidid an gesunden Wistarratten ist mit folgender Tabelle belegt:

Tabelle 2: Restaktivität der DP IV im Serum gegenüber 0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,125, nach oraler Gabe und in Abhängigkeit von der Dosis L-allo-Isoleucyl Thiazolidid, bestimmt 30 min nach Applikation des Inhibitors.

Restaktivität der DP IV in %				
100				
52				
28				
				29

Ausgesprochen überraschend und wünschenswert ist die im diabetischen Tiermodell erzielte Glukose-reduzierende Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs L-allo-Isoleucyl Thiazolidid nach

seiner oralen Verabreichung bei zeitgleicher oraler Glukose-Stimulierung (Tabelle 3).

Zur Verstärkung der blutzuckersenkenden Wirkung verschiedener Antidiabetika werden häufig Kombinationen verschiedener oral wirksamer Antidiabetika eingesetzt. Da sich die antihypergly-kämische Wirkung der efindungsgemäßen Effektoren unabhängig von anderen bekannten oral applizierbaren Antidiabetika entfaltet, eignen sich die erfindungsgemäßen Wirkstoffe analog in entsprechender galenischer Form, zur Erzielung des gewünschten normoglykämischen Effektes, zum Einsatz bei Kombinationstherapien.

Somit können die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen in an sich bekannter Weise in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie z. B. Tabletten, Kapseln, Dragees, Pillen, Suppositorien, Granulate, Aerosole, Sirupe, flüssige, feste und cremeartige Emulsionen und Suspensionen und Lösungen unter Verwendung inerter, untoxischer, pharmazeutisch geeigneter Träger- und Zusatzstoffe oder Lösungsmittel. Hierbei liegen die therapeutisch wirksamen Verbindungen jeweils vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0.1 bis 80, vorzugsweise von 1 bis 50 Masseprozent der Gesamtmischung vor, d.h. in Mengen, die ausreichend sind, um den angegebenen Dosierungsspielraum zu erreichen.

Tabelle 3: Reduktion der zirkulierenden Blutglukose innerhalb 60 min nach oraler Verabreichung von 20 µM L-alloIle-Thiazolidid an Ratten verschiedener Tiermodelle bei zeitgleichem Glukosetoleranztest (Angaben in % bezogen auf normoglykämische Werte).

Tiermodell	Glukosekonzentration in % Kontrolle	Glukosekonzentration in % L-allo-lle-Thiazolidid behandelt
Wistarratte, normal	100	82
Wistarratte (Diabetes 2b - Model, dick)	100	73

Die gute Resorption der erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen durch Schleimhäute des gastrointestinalen Traktes ermöglicht die Anwendung von vielen galenischen Zubereitungen:

Die Substanzen können als Medikament in Form von Dragees, Kapseln, Beißkapseln, Tabletten, Tropfen, Sirup, aber auch als Zäpfchen oder als Nasensprays angewendet werden.

Die Formulierungen werden beispielsweise hergestellt durch Strecken des Wirkstoffs mit Lösungsmitteln und/oder Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgatoren und/oder Dispergiermitteln, wobei z. B. im Fall des Einsatzes von Wasser als Verdünnungsmittel gegebenenfalls organische Lösungsmittel als Hilfslösungsmittel verwendet werden können.

Als Hilfsstoffe seien beispielhaft aufgeführt: Wasser, untoxische organische Lösungsmittel, wie Paraffine (z. B. Erdölfraktionen), pflanzliche Öle (z. B. Rapsöl, Erdnußöl, Sesamöl), Alkohole (z.B. Ethylalkohol, Glycerin), Glykole (z.B. Propylenglykol, Polyetylenglykol); feste Trägerstoffe, wie z. B. natürliche Gesteinsmehle (z. B. hochdisperse Kieselsäure, Silikate), Zucker (z.B. Roh-, Milch- und Traubenzucker); Emulgiermittel, wie nichtionogene und anionische Emulgatoren (z.

B. Polyoxyethylen-Fettsäure-Ester, Polyoxyethylen-Fettalkohol-Ether, Alkylsulfonate und Arylsulfonate), Dispergiermittel (z.B. Lignin, Sulfitablaugen, Methylcellulose, Stärke und Polyvinylpyrrolidon) und Gleitmittel (z.B. Magnesiumstearat, Talkum, Stearinsäure und Natriumlaurylsulfat) und gegebenenfalls Aromastoffe.

Die Applikation erfolgt in üblicher Weise, vorzugsweise enteral oder parenteral, insbesondere oral. Im Falle der enteralen Anwendung können Tabletten außer den genannten Trägerstoffen weitere Zusätze wie Natriumcitrat, Calciumcarbonat und Calciumphosphat, zusammen mit verschiedenen Zuschlagsstoffen, wie Stärke, vorzugsweise Kartoffelstärke, Gelatine und dergleichen enthalten. Weiterhin können Gleitmittel, wie Magnesiumstearat, Natriumlaurylsulfat und Talkum zum Tablettieren mitverwendet werden. Im Falle wäßriger Suspensionen und/oder Elixieren, die für orale Anwendungen gedacht sind, können die Wirkstoffe außer mit den oben genannten Hilfsstoffen zusätzlich mit verschiedenen Geschmacksaufbesserern oder Farbstoffen versetzt werden.

Bei einer parenteralen Anwendung können Lösungen der Wirkstoffe unter Verwendung geeigneter flüssiger Trägermaterialien eingesetzt werden. Im allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, bei intravenöser Applikation Mengen von etwa 0,01 bis 2,0 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 1,0 mg/kg Körpergewicht pro Tag zur Erreichung wirksamer Ergebnisse zu verabreichen, und bei enteraler Applikation beträgt die Dosierung etwa 0,01 bis 2 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit vom Körpergewicht des Versuchstieres oder Patienten bzw. der Art des Applikationsweges, aber auch aufgrund der Tierart und deren individuellem Verhalten gegenüber dem Medikament bzw. Intervall, zu welchem die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muß. Im Fall der Applikation größer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehrere Einzelgaben über den Tag zu verteilen. Für die Applikation in der Humanmedizin ist der gleiche Dosierungsspielraum vorgesehen. Sinngemäß gelten hierbei auch die obigen Ausführungen.

#### Beispiele für pharmazeutische Formulierungen

1. Kapseln mit 100 mg L-allo-Isoleucyl Thiazolidid pro Kapsel:

Für ca. 10 000 Kapseln wird eine Lösung folgender Zusammensetzung hergestellt:

L-allo-Isoleucyl Thiazolidid Hydrochlorid	1,0	kg
Glycerin	0,5	kg
Polyethylenglykol	3,0	kg
Wasser	0.5	kg
	5,0	kg

4,50 kg

Die Lösung wird nach an sich bekannter Weise in Weichgelatinekapseln abgefüllt. Die Kapseln sind zum Zerbeißen oder zum Schlucken geeignet.

2. Tabletten bzw. lackierte Tabletten oder Dragees mit 100 mg L-allo-Isoleucyl Thiazolidid:

Die folgenden Mengen beziehen sich auf Herstellung von 100 000 Tabletten:

L-allo-Isoleucyl Thiazolidid Hydrochlorid,	
fein vermahlen	10,0 kg
Glukose	4,35 kg
Milchzucker	4,35 kg
Stärke	4,50 kg
Dearne	

Zellulose, fein vermahlen

Obige Bestandteile werden gemischt und anschließend mit einer Lösung, hergestellt aus

Polyvinylpyrrolidon		2,0	kg
Polysorbat		0,1	kg
und Wasser	ca.	5,0	kg

versehen und in an sich bekannter Weise granuliert, indem die feuchte Masse geraspelt und nach Zugabe von 0,2 kg Magnesiumstearat getrocknet wird. Die fertige Tablettenmischung von 30,0 kg wird zu gewölbten Tabletten von 300 mg Gewicht verarbeitet. Die Tabletten können nach an sich bekannter Weise lackiert oder dragiert werden.

Die technischen Daten bevorzugter Verbindungen werden nachstehend angegeben.

# Untersuchungen zu Ile-Thia\*Fumarat (Isomere) und anderen Salzen

Substanz	K,	Fp (°C)	CE (min)	MS	[α]H <sub>2</sub> O
L-threo-IT*F	8*10 <sup>-8</sup>	150 <sup>DSC</sup>	160	203	-10,7 (405nm)
D-threo- IT*F	keine Hemmung	147	158	203	nicht bestimmt
L-allo-IT*F	2*10 <sup>-7</sup>	145-6	154	203	-4,58 (380nm)
D-allo-IT*F	keine Hemmung	144-6	150	203	4,5 (380nm)

IT\*F = Isoleucyl-Thiazolidid Fumarat

Die NMR und HPLC Daten bestätigen, daß es sich um die entsprechenden Substanzen handelte

### Meßbedingungen für die K<sub>1</sub>-Bestimmung der Substanzen

Enzym:

DPIV<sub>Schweineniere</sub>, 0,75mg/ml, 18U/ml (GPpNA)

in 25mM Tris pH 7,6, 30% Ammoniumsulfat, 0,5mM EDTA, 0,5mM DTE

Stammlösung: 1:250 verdünnt in Meßpuffer

Puffer:

40mM HEPES pH 7,6, I=0,125 (KCl)

Substrat:

GPpNA\*HCl

Stammlösung: 2,1mM

Meßgerät:

Perkin-Elmer Bio Assay Reader, HTS 7000 Plus,

T=30°C λ= 405nm

Meßansatz:

1 1

100µl Puffer

100µl Substrat (3 verschiedene Konzentrationen 0,8mM - 0,2mM)

50 $\mu$ l Wasser/Inhibitor (7 verschiedene Konzentrationen 2,1 $\mu$ M – 32,8nM)

10μl Enzym

Puffer, Wasser/Inhibitor und Enzym wurden auf 30°C vortemperiert und die Reaktion durch die Zugabe von ebenfalls vortemperiertem Substrat gestartet.
Es wurden 4fach Bestimmungen durchgeführt.
Die Meßzeit betrug 10min.

#### Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden an einem Kofler-Heiztischmikroskop der Leica-Aktiengesellschaft, die Werte sind nicht korrigiert, oder an einem DSC-Gerät (bei Heumann-Pharma) bestimmt.

#### **Optische Rotation**

Die Drehwerte wurden bei unterschiedlichen Wellenlängen an einem "Polarimeter 341" oder höher der Fa. Perkin Elmer aufgenommen.

### Meßbedingungen für die Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem "API 165" bzw. "API 365" der Fa. PE Sciex mittels Elektrosprayionisation (ESI) aufgenommen.

Es wird mit einer ungefähren Konzentration von  $c = 10 \mu g/ml$  gearbeitet, die Substanz wird in MeOH /  $H_2O$  50:50, 0,1 %  $HCO_2H$  aufgenommen, die Infusion erfolgt mit Spritzenpumpe (20 $\mu$ l/min).Die Messungen erfolgten im Positivmodus [M+H]<sup>+</sup>, die ESI-Spannung beträgt U = 5600V.

Die Salze weisen die folgenden Daten auf:

IT*Salz	K,	M (gmol <sup>-1</sup> )	Fp (°C)
Succinat	5,1 e-8	522,73	116
Tartrat	8,3 e-8	352,41	122
Fumarat	8,3 e-8	520,71	156
Hydrochlorid	7,2 e-8	238,77	169
Phosphat	1,3 e-7	300,32	105

## Löslichkeitsuntersuchung der Salze des Ile-Thia

#### Ile-Thia\*Fum

Einwaage 10,55 mg entspricht 0,02 mmol (520,72 g/mol) Zugabe von 100 μl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> 100 μl keine Lösung, optisch: keine Oberflächenbenetzung 21

ab 200 µl sukzessiver Beginn der Löslichkeit bei 400µl ist eine vollständiges Lösen zu beobachten 2,63 % Bei diesem Salz wurde also festgestellt, daß es kaum benetzbar ist und sich nicht zersetzt.

#### Ile-Thia\*Succ

Einwaage 16,6 mg entspricht 0,031 mmol (522,73 g/mol) Zugabe von 16  $\mu$ l  $H_2O_{dest}$  16  $\mu$ l keine Lösung, optisch "Aufsaugen" der Feuchtigkeit von 66  $\mu$ l – 1,5 ml kein vollständiges Lösen der Substanz zu beobachten

#### Ile-Thia\*Tartrat

Einwaage 17,3 mg entspricht 0,049 mmol (352,41 g/mol) Zugabe von 100 μl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> 100 μl vollständiges Lösen 17,3 %

#### Ile-Thia\*Phos

Einwaage 15,5 mg entspricht 0,051 mmol (300,32 g/mol) Zugabe von 100  $\mu$ l  $H_2O_{dest}$  100  $\mu$ l Anlösen ist zu beobachten sukzessive Zugabe von 100  $\mu$ l  $H_2O$  bei 400  $\mu$ l vollständiges Lösen 3,87 %

#### Ile-Thia\*HCl

Einwaage 16,1 mg entspricht 0,067 mmol (238,77 g/mol) Zugabe von 100  $\mu$ l  $H_2O_{dest}$  bei 100  $\mu$ l vollständiges Lösen 16,1 %

22

#### Allgemeine Synthese Ile-Thia\*Salz

Die Boc-geschüzte Aminosäure Boc-Ile-OH wird in Essigsäureethylester vorgelegt, der Ansatz wird auf ca. –5 °C gekühlt. N-Methylmorpholin wird zugetropft, Pivalinsäurechlorid (Labor) bzw. Neohexanoylchlorid (Technikum) wird unter Temperaturkonstanz zugetropft. Die Reaktion wird für wenige Minuten zur Aktivierung gerührt. N-Methylmorpholin (Labor) und Thiazolidinhydrochlorid (Labor) werde nacheinander zugetropft, Thiazolidin (Technikum) wird zugegeben. Die Aufarbeitung im Labor erfolgt klassisch mit Salzlösungen, im Technikum wird der Ansatz mit NaOH- und CH<sub>3</sub>COOH-Lösungen gereinigt. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wird durch HCl / Dioxan (Labor) bzw. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Technikum) erzielt.

Im Labor wird das Hydrochlorid aus EtOH / Ether kristallisiert.

Im Technikum wird das freie Amin durch Zugabe von NaOH / NH<sub>3</sub> dargestellt. Fumarsäure wird in heißen Ethanol gelöst, das freie Amin wird zugetropft, es fällt (Ile-Thia)<sub>2</sub>-Fumarat (M = 520,71 gmol<sup>-1</sup>).

Die Analytik von Isomeren bzw. Enantiomeren erfolgt durch Elektrophorese.

#### Patentansprüche

- Dipeptidverbindung, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet wird, und deren Salze.
- Dipeptidverbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure aus einer natürlichen Aminosäure ausgewählt wird.
- 3. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie bei einer Konzentration von 10 μM eine Aktivitätsminderung von Dipeptidylpeptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten von mindestens 10 % bewirkt.
- 4. Dipeptidverbindung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aktivitätsminderung von mindestens 40 % bewirkt.
- 5. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure aus Leucin, Valin, Glutamin, Prolin, Isoleucin, Asparagin und Asparaginsäure ausgewählt wird.
- 6. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, nämlich L-threo-Isoleucyl Pyrrolidid, L-allo-Isoleucyl Thiazolidid, 1-allo-Isoleucyl Pyrrolidid und deren Salze.
- 7. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Salze organische Salze wie

Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate sind.

- 8. Salze von Dipeptidverbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einem molaren Verhältnis von Dipeptidverbindung zu Salz von 1:1 oder 2:1 vorliegen.
- 9. Salze von Dipeptidverbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, nämlich Fumarsalze.
- 10. Salze von Dipeptidverbindungen nach Anspruch 9, nämlich Fumarsalze von L-threo-Isoleucyl Thiazolidid oder Fumarsalze von L-allo-Isoleucyl Thiazolidid.
- 11. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Verbindung oder deren Salze nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthält.
- 12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Träger für parenterale oder enterale Formulierungen handelt.
- 13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer Formulierung zur oralen Verabreichung vorliegt.
- 14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen hypoglykämisch wirkenden Wirkstoff enthält.

- 15. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur Aktivitätsminderung von Dipeptidylpeptidase IV bzw. von Dipeptidylpeptidase IV bzw. von Dipeptidylpeptidase IV analogen Enzymaktivitäten.
- 16. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikaments zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säugers.
- 17. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung
  eines Medikaments zur oralen Behandlung von mit Diabetes
  mellitus im Zusammenhang stehenden Stoffwechselerkrankungen.
- 18. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

# Kapillarzonenelektrophorese (CE) -Trennung der Isomere des Isoleucyl Thiazolidids

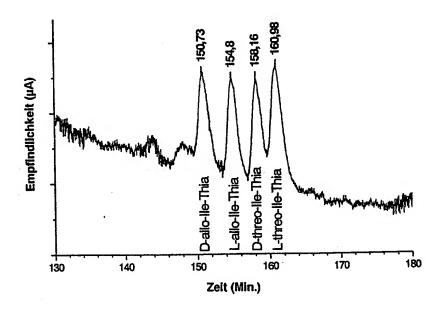


Abb. 1: CE-Trennung von einer 1:1:1:1 – Mischung von L-threo-Ile-Thia\*Fum, L-allo-Ile-Thia\*Fum, D-threo-Ile-Thia\*Fum, D-allo-Ile-Thia\*Fum

## Methode und Meßbedingungen:

CE-Untersuchungen erfolgten am "P/ACE™ System MDQ" der Firma Beckman:

Substanz	CE (min)		
L-threo-IT*F	160		
D-threo-IT*F	158		
L-allo-IT*F	154		
D-allo-IT*F	150		

### Laufbedingungen:

Puffer:

20 mM Phosphat, pH 7,0, 100 mM  $\beta$ -Hydroxy-propyl-cyclodextrin

Kapillare:

50 / 60,2 cm, 25 μm Innendurchmesser, beschichtet mit Acrylamid

Spannung:

10 kV

Detektion:

Photo-Dioden-Array-Detektor bei 214 nm

Temperatur:

: 7°C

# CE-Trennung von Ile-Thia\*Fumarat

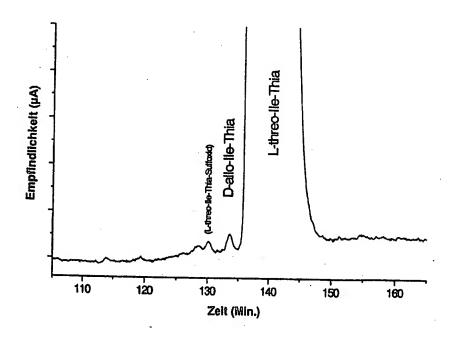


Abb. 2: CE-Trennung von einer 1:1000 Mischung L-threo-Ile-Thia\*Fumarat zu D-allo-Ile-Thia\*Fumarat

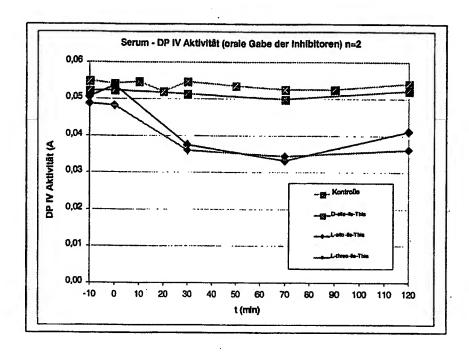
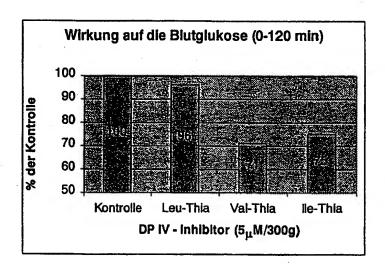


Abb. 3: Serum DP IV-Aktivität nach oraler Applikation verschiedener H-Ile-Thia Stereoisomere (5  $\mu$ M/300 g Ratte). Beeinflussung der Enzymaktivität erflolgt nur durch L-allo-Ile-Thia und L-threo-Ile-Thia.

Abb. 4: Wirkung verschiedener Aminoacyl-Thiazolidide auf die Glukosetoleranz der Ratte (Oraler Glukosetoleranztest mit 2g/300g Wistarratte zum Zeitpunkt 0, Gabe der DP IV-Inhibitoren 10 min vor oraler Glukosestimulierung)



PCT/EP 99/03712

A. CLASS IPC 6	ification of subject matter C07D277/04 A61K31/425 C07D29	5/18 C07D417/12		
According t	o International Series Classification (ISS) and the series			
	o International Patent Classification (IPC) or to both national class SEARCHED	ification and IPC		
	ocumentation searched (classification system followed by classific	ration numbols)		
1PC 6	CO7D A61K			
	tion searched other than minimum documentation to the extent th			
Electronic d	lata base consulted during the international search (name of data	base and, where practical, search terms u	rsed)	
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		<del></del>	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages	Relevant to claim No.	
X	WO 97 40832 A (HANS KNÖLL INSTI NATURSTOFF—FORSCHUNG) 6 November 1997 (1997—11—06) cited in the application claims; examples 2,3	TUT FÜR	1-18	
X	WO 95 15309 A (FERRING BV ) 8 June 1995 (1995-06-08) claims 	-/	1-18	
X Furth	er documents are listed in the continuation of box C.	X Patent tamily members are list	ed in annex.	
* Special cat	egories of cited documents:			
"A" docume consider diling de "L" documes which è citation "O" docume other m	nt defining the general state of the art which is not ered to be of particular relevance locument but published on or after the international ate at which may throw doubts on priority claim(s) or a cited to establish the publication date of another or other spacial reason (as specified) at referring to an oral disclosure, use, exhibition or	<ul> <li>*T* later document published after the I or priority date and not in conflict with the conflict with the principle or invention.</li> <li>*X* document of particular relevance; the cannot be considered novel or care involve an inventive step when the structure of particular relevance; the cannot be considered to involve an document of particular relevance; the cannot be considered to involve an document is combined with one or ments, such combination being obtain the art.</li> <li>*&amp;* document member of the same pate</li> </ul>	ith the application but theory underlying the a claimed invention not be considered to document is taken alone a claimed invention inventive step when the more other such docu- rious to a person skilled	
Date of the a	actual completion of the international search			
•	September 1999	Date of mailing of the International of 17/09/1999	ooaan repon	
Name and m	eiling address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlean 2  NL - 2280 HV Rijswijk  Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni,	Authorized officer		
	Fax: (+31-70) 340-3016 Henry, J			

11

International Application No PCT/EP 99/03712

	Letion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 15, 14 October 1991 (1991-10-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 149947q, SCHOEN EKKEHARD ET AL: "Dipeptidyl peptidase IV in the immune system.Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes" page 37; XPOO2114197 abstract & BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, vol. 372, no. 5, 1991, pages 305-311,	1-18
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER-UNIV. HALLE), 21 November 1991 (1991-11-21) cited in the application abstract	1-18
<b>X</b>	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 2, 13 January 1997 (1997-01-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 16161j, STOECKEL A. ET AL: "Competitive inhibition of proline specific enzymes by amino acid thioxopyrrolidides and thiazolidides" page 241; XP002114198 abstract & PEPT: CHEM.,STRUCT.BIOL.,PROC.AM. PEPT.SYMP., no. 14, 1995, pages 709-710,	1-18
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 25, 21 June 1993 (1993-06-21) Columbus, Ohio, US; abstract no. 255342k, page 933; XP002114199 abstract & JP 04 334357 A (FUJEREBIO INC) 20 November 1992 (1992-11-20) -/	1-18

1

Internauenal Application No
PCT/EP 99/03712

0.40		PCT/EP 99	0/03712
	otion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
(	HEIHACHIRO ET AL: "Synthesis of prolyl endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure-activity relationships: in vitro inhibition of prolyl endopeptidase" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 41, no. 9, 1993, pages 1583-1588, XP002114196 PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP ISSN: 0009-2363 the whole document		1-8
		•	
	·		
(			
	•		
			•
	·		
}			
	·		
	·		
DCT4D4 O1			

ormation on patent family members

rnternamenal Application No PCT/EP 99/03712

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family Publication member(s) Publication date		Publication date	
WO 97	40832	Α	06-11-1997	DE AU	19616486 A 3023397 A	30-10-1997 19-11-1997
				CN	1216468 A	12-05-1999
		·		EP -	0896538 A	17-02-1999
WO 95	15309	A	08-06-1995	AU	1113395 A	19-06-1995
				AU	8421998 A	12-11-1998
				CA -	2178066 A	08-06-1995
				CN	1141033 A	22-01-1997
				CZ	9601595 A	15-01-1997
				EP	0731789 A	18-09-1996
				FI	962315 A	05-08-1996
				HU	76274 A	28-07-1997
				JP	9509921 T	07-10-1997
				NO	962269 A	30-07-1996
				PL	314838 A	30-09-1996
				ZA	9409525 A	02-08-1995
DD 29	6075	Α	21-11-1991	NONE		<del></del>
JP 43	334357	Α	20-11-1992	NONE		

Interna\_encies Aldenzeichen
PCT/EP 99/03712

A. KLAS	SIFIZIERLING DES ANMELDLINGSGEGENSTANDES		
ÎPK 6	sifizierung des ammeldungsgegenstandes CO7D277/04 A61K31/425 CO7D29	5/18 CO7D417/12	
Nach der	Internationalen Patentidassifikation (IPK) oder nach der nationalen K	Flansithesian und das 1016	
	IERCHIERTE GEBIETE	Application and some	···
Recherch	lerter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssym	nhola \	
IPK 6	CO7D A61K		
Recherch	ierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen,	soweit diese unter die recherchierten Gebiet	e fallen
Während	der internationalen Recherche konsultierts elektronische Datenbank	(Name der Datenbank und evtl. verwendete	Suchbegriffe)
. ,			
C. ALS W	VESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategoria	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Ange	abe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 40832 A (HANS KNÖLL INSTIT NATURSTOFF-FORSCHUNG) 6. November 1997 (1997-11-06) in der Anmeldung erwähnt	1-18	
	Ansprüche; Beispiele 2,3		·
X	WO 95 15309 A (FERRING BV ) 8. Juni 1995 (1995-06-08) Ansprüche	•	1-18
		-/	÷
<del>113</del>			
enu	itere Veröffentlichungen eind der Fortsetzung von Feld C zu nehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
"A" Veröffe aber i "E" älteres	re Kategorian von angegebenen Veröffentlichungen : entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedautsem anzusehen ist BOkument, das jedicht erst am oder nach dem Internationalen	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätedatum veröffentlicht Anmektung nicht kollitiert, sondam nur Erfindung zugrundellegenden Prinzips Theorie angegeben ist	Worden ist und mit der
"L" Veröffe	eldedatum veröffentlicht worden ist antlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanapruch zweifelhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenberficht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann ellein aufgrund dieser Veröffentlic erfinderlecher Tätigkeit beruhend betra "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeu	chief werden
"P" Veröffe	offilmt) entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht entlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach beanspruchten Prioritätedatum veröffentlicht worden ist	kann nicht als auf erfinderischer Tätigke werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für einen Fachmann "&" Veröffentlichung, die Mitglied dersetben	einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und naheliegend ist
	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Rec	
3	3. September 1999	17/09/1999	
Name und	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk	Bevollmächtigter Bediensteter	
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Henry, J	

(1

Internacionales Aktenzeichen
PCT/EP 99/03712

		99/03712	
C.(Fortsetz Kategorie*	zung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 15, 14. Oktober 1991 (1991-10-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 149947q, SCHOEN EKKEHARD ET AL: "Dipeptidyl peptidase IV in the immune system.Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes" Seite 37; XP002114197 Zusammenfassung & BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, Bd. 372, Nr. 5, 1991, Seiten 305-311,	1-18	
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER-UNIV. HALLE), 21. November 1991 (1991-11-21) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1-18	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 2, 13. Januar 1997 (1997-01-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 16161j, STOECKEL A. ET AL: "Competitive inhibition of proline specific enzymes by amino acid thioxopyrrolidides and thiazolidides" Seite 241; XP002114198 Zusammenfassung & PEPT: CHEM.,STRUCT.BIOL.,PROC.AM. PEPT.SYMP., Nr. 14, 1995, Seiten 709-710,	1-18	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 25, 21. Juni 1993 (1993-06-21) Columbus, Ohio, US; abstract no. 255342k, Seite 933; XP002114199 Zusammenfassung & JP 04 334357 A (FUJEREBIO INC) 20. November 1992 (1992-11-20) ————————————————————————————————————	1-18	

1

Internacionaleo Aktenzeichen
PCT/EP 99/03712

C.(Fortoetz	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	PCT/EP 9	13/17	
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme	enden Teite	Betr. Anspruch Nr.	
X	HEIHACHIRO FT Al . "Synthesis of proly]			
	endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure-activity relationships: in vitro inhibition of prolyl endopeptidase" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 41, Nr. 9, 1993, Seiten 1583-1588, XP002114196 PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP	1-8		
	ISSN: 0009-2363 das ganze Dokument			
	•			
,				
	•			

1 1

1

Angaben zu Veröffentlichun die zur selben Patenttamilie gehören

Interne....nates Aktenzeichen PCT/EP 99/03712

Im Recherchenbericht ingeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9740832	A	06-11-1997	DE	19616486 A	30-10-1997
NO 5/7003E	.,		ĀŪ	3023397 A	19-11-1997
			CN	1216468 A	12-05-1999
•			EP	0896538 A	17-02-1999
WO 9515309	A	08-06-1995	AU	1113395 A	19-06-1995
	• •		AU	8421998 A	12-11-1998
			CA	2178066 A	08-06-1995
			CN	1141033 A	22-01-1997
			CZ	9601595 A	15-01-1997
			EP	0731789 A	18-09-1996
			FI	962315 A	05-08-1996
			HU	76274 A	28-07-1997
			JP	9509921 T	07-10-1997
			NO	962269 A	30-07-1996
			PL	314838 A	30-09-1996
			ZA	9409525 A	02-08-1995
DD 296075	A	21-11-1991	KEINE		
JP 4334357	Α	20-11-1992	KEINE		